SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 01-2330-1991

Penentuan clostridium botolinum

ICS

Badan Standardisasi Nasional

Daftar isi

Penentuan clostridium botolinum

0 Pendahuluan

Clostridium Botulinum adalah spesies anaerobik, membentuk spora, bakteri berentuk bulat memproduksi protein-dengan karakteristik neurotoksisitas. Botulism, racun yang berbahaya, dihasilkan dari mengkonsumsi makanan yang mengandung toksin botulinum yang diproduksi pada saat bakteri tersebut tumbuh dalam makanan. Botulism sangat jarang ditemukan tetapi mempunyai tingkat kematian yang sangat tinggi. Telah tercatat 672 kasus keracunan di Amerika Serikat sejak tahun 1899 sampai 1972. Kasus ini meliputi 1731 kejadian yang menyebabkan 963 kematian. Kasus-kasus tersebut di mana jenis toksinnya telah ditentukan, 148 disebabkan oleh toksin jenis A, 39 oleh jenis B, F 19 oleh jenis E dan 1 oleh jenis F. Pada dua kasus menunjukkan adanya toksin A dan B secara bersamaan. Terbatasnya laporan adanya toksin C dan D sebagai penyebab botulism pada manusia belum dapat diterima secara umum. Akan tetapi semua, kecuali jenis F dan G yang belum dipelajari secara mendalam, adalah sangat penting pengaruhnya sebagai penyebab botulism pada binatang.

Antigenik dari C. botulinum yang telah diidentifikasi menunjukkan bahwa toksin-toksinnya dapat dinetralisir secara kongkrit hanya dengan menggunakan antitoksin yang sesuai, dan netralisir silang dengan jenis antitoksin yang tidak sesuai ditemukan dalam jumlah yang sangat sedikit atau hampir tidak ada. Terdapat 7 jenis : A, B, C, D, E, F dan G. Lima diantaranya memproduksi hanya satu jenis toksin, tetapi semuanya mempunyai riama khusus terhadap toksintoksinnya. Jenis C dan D bereaksi silang dengan anti toksin satu sama lainnya karena mereka masing-masing memproduksi lebih dari satu toksin dan paling tidak mempunyai satu komponen toksin yang sama. Jenis C memproduksi toksin C, , secara dominan dengan sedikit toksin D dan (Ca) atau hanya C_2 (CO dan jenis D memproduksi toksin D secara dominan bersama-sama dengan toksin C_i dan C2 dalam jumlah yang lebih sedikit. Campuran toksin juga dapat diproduksi oleh C. botulinum. Terdapat sifat mutual netralisasi silang antara jenis E dan F dan Baru-baru ini C. botulinum menunjukkan bahwa is dapat memproduksi campura toksin dengan jenis A dalam jumlah yang dominan dan jenis F dalam jumlah yang lebih sedikit.

Selain dari melihat jenis toksin. C. botulinum dapat dibedakan menjadi 3 kelompok berdasarkan dari karakteristik kultur, biokimia dan fisiologi. Kultur yang memproduksi toksin C dan D bersifat non proteolotik terhadap gumpalan putih telur dan daging, dan memiliki pola metabolik yang umum yang membedakan mereka dari yang lain.

Semua jenis A, B dan F diproduksi oleh strain proteolotik. Strain yang memproduksi E, B dan F sisanya adalah non proteolitik, dengan pola metabolik karbohidrat yang berheda dengan kelompok non proteolitik yang memproduksi toksin C dan D. Strain yang memproduksi toksin G belum dipelajari secara terperinci untuk dapat memberikan karakteristik yang memuaskan.

C. botulinum terdapat banyak di tanah aan dalam endapan lautan dan danau. Ditemukannya jenis E dalam daerah perairan oleh beberapa peneliti mempunyai korelasi dengan botulism

jenis E dalam ikan atau makanan taut lainnya. Jenis A dan B umum dijumpai pada bahan makanan yang terkontaminasi tanah. Di Amerika Serikat, sayuran kaleng yang dibuat oleh industri-industri rumah tangga umum terkontaminasi oleh jenis A dan B tetapi di Eropa produk berasal dari daging juga merupakan media terjadinya gangguan saluran pencernaan.
Cara untuk mencegah, botulism termasuk penurunan tingkat kontaminasi mikroba, pengasaman, penurunan kadar air dan apabila mungkin, pemusnahan semua spora-spora botulinum dalam bahan makanan. Pemanasan merupakan cara yang umum untuk pemusnahan tersebut. Makanan kaleng yang mengalami penanganan dengan baik tidak akan mengandung C. botulinum. Industri rumah tangga merupakan sumber dari botulism bila dibandingkan dengan komersial industri, yang mana mungkin disebabkan karena pengalengan secara komersial lebih terjamin penggunaan panasnya.
Suatu makanan dapat mengandung C. botulinum yang hidup dan tetap tidak menyababkan botulism. Apabila tidak ada mikroorganisma yang tumbuh, tidak ada toksin yang diproduksi. Banyak bahan makanan yang memenuhi kebutuhan zat gizi C. botulinum, tetapi tidak semuanya memiliki kondisi anaerobik yang dibutuhkan. Kedua faktor gizi dan anaerobik dipenuhi oleh banyak makanan kaleng dan berbagai macam makanan yang berasal dari daging dan ikan. Pertumbuhan dalam makanan yang memenuhi persyaratan tersebut dapat dicegah apabila produksi secara alami atau disengaja adalah asam (mempunyai pH yang rendah), mempunyai kadar water activity rendah, mempunyai kadar NaCl tinggi, memiliki substansi penghambat ($NaNO_2$), atau memiliki 2 atau lebih kombinasi kondisi tersebut. Penyimpanan dalam refrigator tidak dapat mencegah pertumbuhan toksin oleh strain-strain non-proteolitik, kecuali apabila suhunya benar dipertahankan sampai di bawah 3°C. Media botulism umumnya adalah makanan yang diproses untuk mencegah kerusakkan dan umumnya tidak disimpan dalam refrigerator.
Suhu optimum untuk pertumbuhan dan produksi toksin dari strain proteolitik adalah mendekati 35°C, sedangkan strain non-proteolitik adalah 26°C. Jenisjenis non-proteolitik B, E dan F dapat memproduksi toksin pada suhu refrigerator (3-4°C). Toksin dari non-proteolitik tidak mempunyai sifat toksisitas sampai mereka di aktifiasi oleh tripsin; sedangkan toksin proteolitik biasanya berada dalam bentuk aktif sepenuhnya atau mendekati tingkat maksimal. Perbedaan itu sangat penting dalam pengamatan epidemiologi dan laboratorium untuk menentukan kadar botulism. Diagnosa klinis terhadap botulism mengindentifikasi toksin botulism dalam darah. feces, atau muntahan penderita. Sedia-sediaan harus dikumpulkan sebelum pemberian anti toksin botulism pada penderita. Penentuan makanan penyehab adalah sangat penting untuk mencegah kasus botulism berikutnya.

1 Peralatan

1.1 Refrigerator.
1.2 Handuk yang kering dan bersih.
1.3 Bunsen burner.
1.4 Pembuka kaleng steril.
1.5 Mortar dan alu steril.
1.6 Forseps steril.

1.7 Pipet steril.
1.8 Wadah blender steril.
1.9 Tabung reaksi bertutup steril.
1.10 Anaerobic jar (Gas pack).
1.11 Incubator 35°C dan 26°C.
1.12 Mikroskop.
1.13 Petridish steril.
1.14 Wadah penyimpan serum steril.
1.15 Tabung sentrifugal.
1.16 Sentrifugal refrigerasi dengan kecepatan tinggi.

2 Media dan reagensia

2.1 Larutan yodium alkohol atau diserifektan lain.
2.2 Cooket meat — liver atau beef heart.
2.3 Trypticase teptone glukose yeast-extract broth with trypsin (TPGYT).
2.4 Liver — veal egg yolk agar atau anaerobic egg yolk agar.
2.5 Gel — phosphate buffer steril, pH 6,2.
2.6 Alkohol absolut.
2.7 Reagensia pewarna gram, crystal violet, atau larutan methylene blue.
2.8 Physiological saline.
2.9 Larutan trypsin (disiapkan dari Difco 1 : 250).

3 Persiapan contoh

3.1 Pemeriksaan awal.

3.1.1 Contoh harus dimasukkan ke dalam refrigerator sampai waktu pengujian akan dilaksanakan kecuali pada bahan makanan kaleng yang masih tertutup (kecuali apabila menggembung sekali dan dalam keadaan akan meletus).
3.1.2 Sebelum melakukan pengujian, catat hal-hal sebagai berikut :

1). Tujuan dari pengiriman produk.
2). Produsen.
3). Asal bahan (contoh).
4). Jenis dan ukuran dari wadah.
5). Pemberian label.
6). Kode produksi.
7). Kondisi dari wadah.

3.1.3 Bersihkan wadah dan beri kode pengujian.
3.1.4 Makanan padat :

1). Pindahkan bahan makanan dengan atau tanpa air yang terbawa aseptis ke mortar.
2). Tambahkan larutan gel--phosphate buffer dengan jumlah yang sama dan

hancurkan dengan menggunakan alu steril dalam persiapan inokulasi.

3). Atau inokulasi enrichment broth dengan sepotong bahan secara steril.

3.1.5 Inokulasi kultur media dengan larutan bahan tersebut secara steril dengan menggunakan pipet.

3.1.6 Simpan bahan larutan di atas (sisanya), pindahkan dalam wadah steril sampai pengujian berikutnya apabila diperlukan.

3.2 Pembukuan kaleng.

3.2.1 Bersihkan bagian kaleng yang tidak diberi kode dengan menggunakan disinfektan :

1). Biarkan beberapa menit.
2). Hilangkan disinfektan.
3). Bersihkan daerah tersebut dengan menggunakan handuk kering dan bersih.
4). Siram permukaan tersebut dengan menggunakan larutan Yodium alkohol dan bakar.

3.2.2 Apabila kaleng sudah menggembung letakkan kaleng sehingga bagian vertikal dari sambungan kaleng tidak menghadap pemeriksa.

3.2.3 Apabila wadah mempunyai tepi yang melengkung, dinginkan kaleng sebelum dibuka dan dibakar secara hati-hati untuk menghindarkan meletaknya kaleng.

3.2.4 Pindahkan piring logarn (sekitar 5 cm diameternya kecuali pada kaleng nomor 202 di mana piringnya berdiameter 3 cm) dari bagian tengah yang dibakar dengan menggunakan pemotong stern atau Bacti-disc yang telah diautoclave.

3.3 Periksa kenampakan dan bau dari produk.

3.3.1 Catat terjadinya dekomposisi produk.

3.3.2 Jangan mencicipi bahan makanan tersebut.

3.3.3 Catat hasilnya.

4 Penentuan C. Botulinum

4.1 Pengkhayalan.

Keluarkan oksigen yang larut dalam media pengkayaan dengan mengukus 10—15 menit dan segera dinginkan tanpa mengaduk sebelum melakukan inokulasi.

4.1.1 Inokulasi 2 tabung berisi cooked meat medium dengan 1-2 gram bahan padat atau 1¯2 ml larutan bahan pada setiap 15 ml enrichment broth. Inkubasi pada 35°C.

4.1.2 Inokulasi 2 tabung TPGYT seperti di atas. Inokulasi pada 26°C.

4.1.3 Masukkan inokulum secara perlahan-lahan sedikit di bawah permukaan broth.

4.1.4 Setelah 5 hari inkubasi periksa kultur dalam pengkayaan :

1). Periksa terjadinya penggumpalan (pengendapan).
2). Periksa terbentuknya gas.
3). Periksa partikel daging yang dicerna.
4). Catat bau.
5). Periksa dengan mikroskop dengan menggunakan gram stain, kristal violet atau methylene blue dengan sinar yang cukup.

6). Periksa morfologi dari organisme dan catat ciri-ciri dari sel clostridium dengan terlihatnya sporulasi dan letak spora di dalam sel.

7). Apabila pada pengkayaan tersebut tidak tampak terjadinya pertumbuhan setelah 5 hari, inkubasi kembali selama 10 hari untuk mendeteksi kemungkinan terjadinya germinasi spora C. botulinum yang terlambat.

8). Untuk isolasi kultur murni, simpan kultur pengkayaan pada puncak sporu-
lasi dan simpan dalam refrigerator.

4.2 Isolasi kultur murni.

C. botulinum mudah diisolasi dari campuran flora kultur pengkayaan atau sediaan asli apabila sudah terjadi sporulasi yang baik.

4.2.1 Penanganan pendahuluan dari sediaan sebelum penanaman :

1) Tambahkan dengan kadar volume yang sama alkohol absolut yang telah disterilisasi dengan menggunakan filter ke dalam 1 ml atau 2 ml kultur ke dalam tabung bertutup steril. Aduk hingga homogen dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruangan.

2). Untuk isolasi yang berasal dari contoh, ambil 1 atau 2 ml dari porsi sisanya; tambahkan dengan volume yang sama alkohol absolut yang telah disterilisasi dengan menggunakan filter dalam tabung yang bertutup steril. Aduk hinggahomogen dan inkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.

3). Cara lain, panaskan 1 atau 2 ml kultur pengkayaan untuk memusnahkan sel vegetatif (80°C selama 10—15 menit). Jangan gunakan pemanasan untuk C. botulinum jenis non-proteolotik.

4.2.2 Penanaman kultur yang telah ditangani :

1) Dengan menggunakan jarum inokulasi berdiamater, goreskan 1 atau 2 jarum penuh dari kultur-kultur alkohol atau yang telah mengalami pemanasan ke liver veal egg yolk agar atau/dan anaerobic egg yolk agar dengan tujuan untuk mendapatkan koloni yang telah diisolasi.

    a). Encerkan kultur untuk mendapatkan koloni yang terpisah dengan baik.

    b). Keringkan agar dalam piring untuk mencegah penyebaran koloni.

    c). Gunakan piring dengan tutup porselen, tutup aluminium yang dilapisi piring penyerap, atau keringkan piring pada suhu 35°C selama 24 jam sebelum penggoresan.

2) Inkubasi piring yang telah digores pada suhu 35°C selama 48 jam dalam kondisi anaerob. Anaerobic jar atau Gas Pack cukup untuk memberikan kondisi anaerob, dapat juga digunakan sistem lain.

5 Seleksi koloni C. Botulinum

5.1 Pilih sekitar 10 koloni yang terpisah-pisah dengan baik.

5.1.1 Koloni dapat tinggi atau datar.

5.1.2 Koloni dapat halus atau kasar.

5.1.3 Koloni umumnya menunjukkan penyebaran dan mempunyai pinggir yang tidak rata.

5.1.4 Pada media egg yolk, koloni biasanya menunjukkan permukaan yang berwarna-warni, apabila dilihat dengan sinar tidak langsung. Zone yang berkilauan tersebut kadang-kadang dinamakan lapisan mutiara; ini biasanya meluas sampai melebihi batas atau mengikuti bentuk koloni.

5.1.5 Selain zone mutiara, koloni C. botulinum jenis C, D dan E biasanya dikelilingi oleh zone lebar (2—4 mm) dari lapisan endapan. Koloni jenis A dan B umumnya memperlihatkan zone lapisan endapan yang lebih kecil.

5.1.6 Kesulitan akan dijumpai dalam mengambil koloni toksin sebab beberapa jenis Clospidium memproduksi koloni dengan karakteristik morfologi yang mirip tetapi tidak memproduksi toksin.

5.2 Inokulasi setiap koloni terpilih ke dalam tabung yang berisi broth steril dengan jarum inokulasi berdiameter steril.

5.2.1 Inokulasi C. botulinum jenis E ke dalam TPGYT broth.

5.2.2 Inokulasi jenis C. botulinum lainnya ke dalam cooked meat medium.

5.2.3 Inkubasi kultur koloni terpilih seperti pada 4.1.1. dan 4.1.2. selama 5 hari.

5.3 Buat goresan ulangan dari kultur toksik pada egg yolk agar medium duplikat.

5.3.1 Inkubasi 1 piring secara anaerob pada suhu 35°C.

5.3.2 Inkubasi lainnya secara anaerob pada suhu 35°C.

5.3.3 Apabila koloni C. botulinum dijumpai hanya pada piring anaerob (tidak ada • pertumbuhan pada piring anaerob), kultur adalah murni.

5.3.4 Kegagalan memperoleh C. botulinum dui paling tidak 1 dari koloni terpilih berarti populasinya dalam campuran flora adalah rendah. Pengulangan serf melalui penambahan langkah-langkah pengkayaan dapat meningkatkan jumlah sehingga dimungkinkan isolasi.

Lampiran 1 media pembiakan

Beberapa dari formulasi media tercantum dalam lampiran ini tersedia secara komersial baik dalam bentuk dehidrasi atau yang langsung dapat digunakan. Kecuali adanya ketentuan-ketentuan yang diperlukan, formulasi komersial tersebut telah dibuktikan baik untuk digunakan pada metode pengujian yang tercantum di atas. Akan tetapi instruksi untuk penyiapan media harus benar-benar ditaati. Beberapa formulasi komersial berbeda dengan formulasi aslinya, sebab :

(1) adanya beberapa modifikasi yang telah dikembangkan atau

(2) pembuat media telah menemukan bahwa beberapa perbedaan konsentrasi dan jenis bahan, kontrol pH yang lebih baik, produktivitas, hambatan dan sebagainya dapat dipertahankan.

Perubahan-perubahan ini biasanya mendorong kegunaan dari media untuk tujuan-tujuan tersebut. Perubahan-perubahan formula telah dibuktikan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan mikoorganisma jika dibandingkan dengan formula aslinya. Selain itu, pengawasan terhadap kualitas dari media komersial memerlukan pengujian-penguhian untuk produktivitas, hambatan dan sebagainya untuk setiap lot media dengan pengujian kontrol mikoorganisma terpilih secara hati-hati. Oleh sebab itu kualitas dari media dehidrasi pada umumnya mempunyai tingkat yang lebih baik dibandingkan dengan media yang dibuat di laboratorium.

Merupakan suatu hal yang harus dilakukan untuk menginkulasi 1 set mikroorganisma kontrol pada setiap lot media. Pelaksanaan ini sangat disarankan terutama pada laboratorium yang berhubungan dengan riset dan pengembangan metode analisa yang tergantung pada karakteristik biokimia spesifik dari mikroorganisma.

1. COOKED MEAT MEDIUM

Beef heart	454 g
Proteose peptone	20 g
Dextrose	2 g
Sodium chloride	5 g

Larutkan 12,5 g comercial dehydrate cooked meat medium ke dalam 100 ml aquadest dingin. Aduk hingga homogen dan biarkan selama 15 menit hingga semua partikel menjadi basah. Medium dapat juga dibuat dengan memasukkan 1,25 g ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 10 ml aquadest dan larutkan hingga homogen dan basahkan semua partikel. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit. pH akhir 7,2.

2. LIVER VEAL EGG YOLK AGAR (LVYE)

Telur segar (bebas antibiotik)

kuning telur saja	2—3 butir
Liver veal agar (Difco)	1liter

Cuci telur-telur dengan sikat yang kaku dan tiriskan. Rendam telur dalam larutan mercurie

chloride 0,1% selama 1 jam. Buang larutan tersebut dan ganti dngan etil alkohol 70%, dan rendam selama 30 menit. Pecahkan secara aseptis, dan buang putihnya. Pisahkan kuning telur dengan saringan. Letakkan kuning telur pada wadah steril dan tambahkan larutan NaCl (0,85%) steril dengan volume yang sama. Aduk hingga homogen ke dalam tiap 500 ml liver veal agar leleh (50°C) steril, tambahkan 40 ml suspensi egg yolk-saline. Aduk hingga homogen dan tuang pada petridish. Keringkan petridish pada suhu ruang selama 2 hari, atau 35°C selama 24 jam. Buang petri-petri yang terkontaminasi dan simpan yang steril pada refrigerator.

Comercial Dehydrated Liver Veal Agar.

Liver, infusion from	50,0 g
Veal, infusion from	500,0 g
Proteose, infusion from	20,0 g
Neopeptone	1,3 g
Tryptone	1,3 g
Dextrose	5,0 g
Starch, soluble	10,0 g
Isoelectric casein	2,0 g
Sodium chloride	5,0 g
Sodium nitrate	2,0 g
Gelatine	20,0 g
Agar	15,0 g
Aquadest	1000 ml
Final pH,	7,3 ± 0,2.

3. TRYPTICASE—PEPTONE—GLUCOSE—YEAST EXTRACT BROTH WITH TRYPSIN (TPGYT).

Trypticase	50 g
Bacto-peptone	5 g
Yeast-extract	20 g
Dextrose	4 g
Sodium thioglycollate	1 g
Aquadest	1 liter

Larutkan bahan-bahan padat pada aquadest dan bagikan dalam volume yang cukup untuk digunakan (15 ml dalam tabung 20 x 50 mm atau 100 ml dalam hotol 6 oz), autoclave pada suhu 121°C, 6 menit (15 ml porsi) atau 12 menit (100 ml porsi) 7,0. Refrigerasi dan buang apahila tidak digunakan setelah 2 minggu. Tambahkan tripsin segera sehelum penggunaan. Siapkan 1,5% larutan aquadest tripsin. Sterilisasi melalui Millipore (atau yang sejenis) 0,45 mm filter dan refrigerasi hingga saat diperlukan. Kukus atau didihkan broth selama 10—15 menit untuk mengusir 02 ke luar, dinginkan dengan cepat, dan tambahkan 1,0 ml tripsin secara aseptis ke dalam masing-masing 15 ml broth.

4. DESINFEKTAN

Desinfektan-desinfektan di hawah ini cocok untuk digunakan dalam persiapan analisa mikrohiologi untuk makanan-makanan kaleng.

1). Larutan alkohol untuk ioidin

Potassium iodin	10 g
Iodin	l0 g
Ethyl alcohol (70—95%)	500 ml

2). Larutan sodium hypochlorite

Sodium hypochlorite	5,0 — 5,25 g
Aquadest	1000 ml

3). Setiap bahan pemutih yang dibuat dengan sodium hypochlorite sebagai bahan pengaktif.

4). Larutan Formaldehyde (37%).

5. DILUEN GEL — PHOSPHATE

Gelatine	2 g
Sodium phosphate ($Na_2 HPO_4$)	4 g
Aquadest	11 ml

Larutkan semua bahan dengan pemanasan perlahan-lahan. Sterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. pH akhir 6,2.

6. LARUTAN PHYSIOLOGICAL SALT (STERIL)

Sodium chloride	8.5 g
Aquadest	1 liter

Larutkan 8,5 g NaCl dalam 1 liter aquadest. Autoclave 121°C, 15 menit dan dinginkan sampai suhu ruang.

7. PEWARNA CRYSTAL VIOLET

1). Crystal violet dalam alkohol

Crystal violet (mengandung 90% warna)	2 g
Ethyl alcohol (95%)	20 ml
Aquadest	80 ml

2). Amonium oxalate crystal violet (Hucker's)

Lihat pewarna gram

Kedua larutan ini cocok untuk pengamatan morfologi dari pewarnaan yang sederhana.

8. PEWARNAAN GRAM

1). Hucker's Crystal Violet.

a). Larutan A

Crystal violet (mengandung 90% warna)	2 g
Ethyl alcohol (95%)	20 ml

B). Larutan B

Amonium oxalate	0.8 g
Aquadest	SO ml

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring me'laiui kertas penyaring kasar.

2) Gram's Iodine

Iodine	1 g
Potassium iodine	2 g
Aquadest	300 ml

Letakkan KI dalam mortar, tambahkan iodine, dan giling dengan alat penggiling selama 5—10 detik. Tamhahkan 1 ml air dan giling, kemudian 5 ml air dan giling, lalu 10 ml dan giling. Pada saat ini KI dan iodine menjadi suatu larutan. Tuang dalam hotol reagensia. Bilas mortar dan penggiling dengan air yang cukup hingga diperoleh volume 300 ml.

3). Hucker's Counterstain (Larutan stock)

Safranin 0 (disertifikasi)	2,5 g
Ethyl alcohol (95%)	100 ml

Penggunaannya, tambahkan 10 ml larutan stock ke dalam 90 ml aquadest.

9. PROSEDUR PEWARNAAN

Fiksasi film yang kering karena diangin-anginkan dengan melewatkan film melalui api burner dengan cepat sebanyak 3¯4 kali. Warnai film selama 1 menit dengan larutan crystal violet ammonium oxalate, dan cuci sebentar dengan air mengalir (jangan lebih dari 5 detik).
Bubuhkan Gram Iodine selama 1 menit. Cuci dengan air kran. Dekdorisasi dengan 95% ethyl alcohol sampai 15 dak ada lagi warna biru (sekitar 30 detik). Sebagai prosedur alternatif rendam slide dengan alkohol, segera angkat, dan rendam lagi dengan alkohol selama 10 detik.
Cuci dan hilangkan kelebihan air, dan bubuhkan safranin counterstain selama 1 menit.
Beberapa dari organisma-organisma gram—negatif tidak dapat segera melepaskan warna setelah diadakan pewarnaan dengan Hucker's crystal violet. Bila bekerja dengan gonococcos, encerkan larutan crystal violet 1 : 5 dengan aquadest dan campur 1 bagian larutan crystal violet yang telah diencerkan tersebut dengan 4 bagian larutan amonium oxalate. Bila bekerja dengan bakteria anaerob, campur 1 bagian Hucker's crystal violet dengan 1 bagian sodium bicarbonate 1% segera sebelum pewarnaan.